

CD 30. September
CD 30. September

Empfangsbescheinigung

DEUTSCHES PATENTAMT

① In der Anschrift Straße, Haus-Nr. und ggf. Postfach angeben	Sendungen des Deutschen Patentamts sind zu richten an: PA Dr. Hans D. Boeters c/o PAe Boeters & Bauor Bereiteranger 15 81 541 München		Antrag auf Erteilung eines Patents	
			Aktenzeichen (wird vom Deutschen Patentamt vergeben) 196 47 580.5	
②	Zeichen des Anmelders/Vertreters (max. 20 Stellen) 8371-GBF		Telefon des Anmelders/Vertreters 65 00 86	
③	Der Empfänger in Feld ④ ist der <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder <input type="checkbox"/> Zustellungsbevollmächtigte		Datum 18. Nov. 1996	
④	Anmelder Gesellschaft für Biotechno- logische Forschung mbH (GBF) Mascheroder Weg 1 38 124 Braunschweig		Vertreter und PA Dipl.-Ing. Robert Bauer Dr. Enno Meyer	
⑤	sowohl bekannt Anmeldercode-Nr.		Vertretercode-Nr.	
⑥	Bezeichnung der Erfindung (bei Überlänge auf gesondertem Blatt - 2fach) Epothilone C und D, Herstellung und Mittel			
⑦	Sonstige Anträge <input type="checkbox"/> Die Anmeldung ist Zusatz zur Patentanmeldung (zum Patent) → <input type="checkbox"/> Prüfungsantrag - Prüfung der Anmeldung (§ 44 Patentgesetz) <input type="checkbox"/> Recherchenantrag - Ermittlung der öffentlichen Druckschriften ohne Prüfung (§ 43 Patentgesetz) <input type="checkbox"/> Lieferung von Ablichtungen der ermittelten Druckschriften im <input type="checkbox"/> Prüfungsverfahren <input type="checkbox"/> Rechercherverfahren <input type="checkbox"/> Aussetzung des Erteilungsbeschlusses auf _____ Monate (§ 49 Abs. 2 Patentgesetz) (Max. 15 Mon. ab Anmelde- oder Prioritätstag)		Aktenzeichen der Hauptanmeldung (des Hauptpatents)	
⑧	Erklärungen <input type="checkbox"/> Teilung/Ausscheidung aus der Patentanmeldung → an Lizenzvergabe interessiert (unverbindlich) <input type="checkbox"/> mit vorzeitiger Offenlegung und damit freier Akteneinsicht einverstanden (§ 31 Abs. 2 Nr. 1 Patentgesetz)		Aktenzeichen der Stammanmeldung	
⑨	Inländische Priorität (Datum, Aktenzeichen der Voranmeldung) Ausländische Priorität (Datum, Land, Aktenz. der Voranmeldung) } bei Überlänge auf gesondertem Blatt - 2fach			
⑩	Gebührenaufzahlung in Höhe von _____ DM <input type="checkbox"/> Scheck <input checked="" type="checkbox"/> Überweisung (nach Erhalt der Empfangsbescheinigung) Erläuterung und Kosten- hinweise s. Rückseite		Abbuchung von meinem/unserem Ab- buchungskonto b. d. Dresdner Bank AG, München <input type="checkbox"/> Nr.:	

Diese Patentanmeldung ist an dem durch Perforierung angegebenen Tag beim Deutschen Patentamt eingegangen. Sie hat das mit "P" gekennzeichnete Aktenzeichen erhalten.
Dieses Aktenzeichen ist gemäß den Anmeldebestimmungen bei allen Eingaben anzugeben. Bei Zahlungen ist der Verwendungszweck hinzuzufügen.

Nur von der Annahmestelle auszufüllen:

☐ Für die obengenannte Anmeldung sind Gebühren-
marken im Wert von _____ DM entrichtet

Anmeldung (eingetragen)
Erfindung (Forschung) über-
wiegend (Forschung)
Dr. P. Boschein, bereits erteilt

Bitte beachten Sie die Hinweise
auf der Rückseite
der zurückgehaltenen Antragsdurchschrift

P 2007
5.93 **EB**

PAK 02

Bestell-Nr. 02410 Nachdruck verboten
Carl Heymanns Verlag KG, Luxemburger Straße 449, 50939 Köln

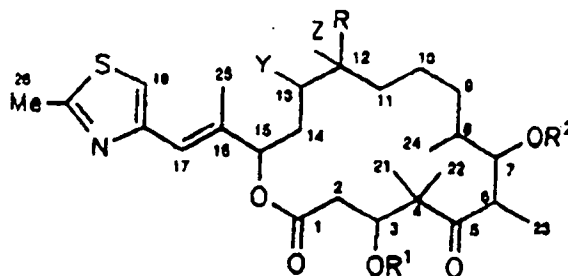
vertraulich/ confidential

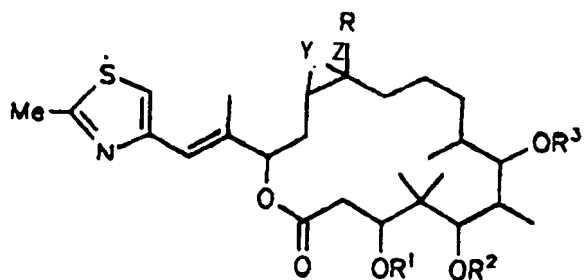
18. November 1996/he

Unser Zeichen: 8371-GBF

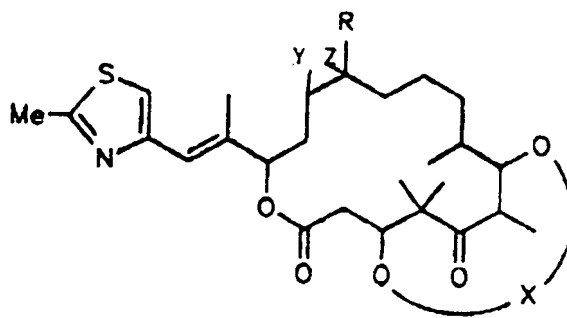
Epothilone C und D, Herstellung und Mittel

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonderivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonderivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.

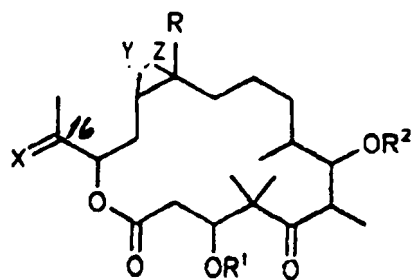




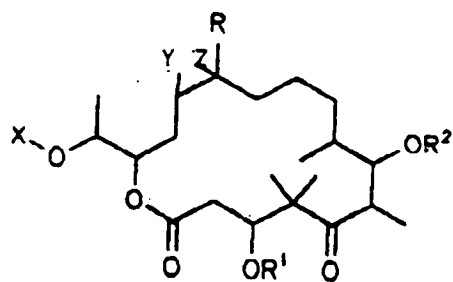
2



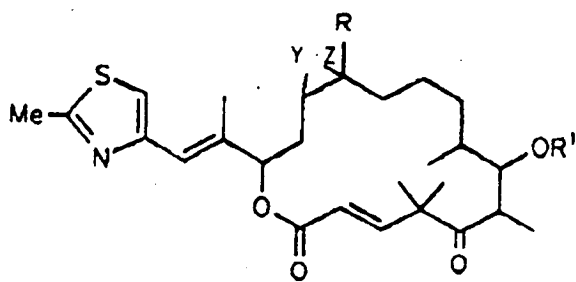
3



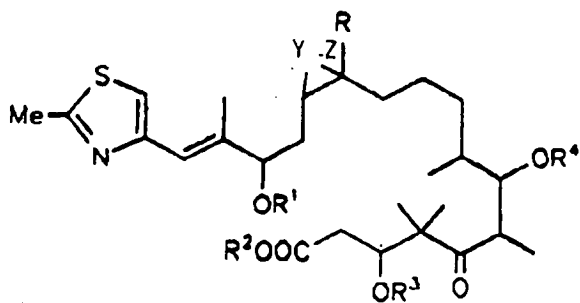
4



5



6



7

- 4 -

In den vorstehenden Formeln 1 bis Formel 7 bedeuten:

R = H, C₁₋₄-Alkyl;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁₋₆-Alkyl,

C₁₋₆-Acyl-Benzoyl,

C₁₋₄-Trialkylsilyl,

Benzyl,

Phenyl,

C₁₋₆-Alkoxy-,

C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-

substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;

wobei auch zwei der Reste R¹ bis R⁵ zu der Gruppierung -(CH₂)_n- mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;

Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl, Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder -N₃, OH, O-(C₁₋₆)-Acyl, O-(C₁₋₆)-Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden.

In der Formel 3 steht X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R²-, wobei R¹ und R² die Bedeutung haben wie oben angegeben, und -SiR₂-, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der Formel 4 bedeutet X Sauerstoff, NOR³, N-NR⁴R⁵, und N-NHCONR⁴R⁵, wobei die Reste R³ bis R⁵ die oben angegebene Bedeutung haben.

In der Formel 5 bedeutet X Wasserstoff, C₁₋₁₈-Alkyl, C₁₋₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042. Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 1 sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine $X = \text{Hal}$, $Y = \text{OH}$ und $Y = \text{OH}$, $Y = \text{Hal}$ erhält. Protonensäuren wie z.B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z.B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH_3/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 2 sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z.B. mit NaBH_4 in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen Formel 2 erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionellen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflats ergeben Verbindungen der allgemeinen Formel 3. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen Formel 3 entstehen durch Umacetalisierung z.B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 4 werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z.B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fachmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrazone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinierung in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z.B. mit einem Aluminium- oder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen Formel 5 erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z.B. bei O-Formyl durch NH_3/MeOH , bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel 6 werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z.B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z.B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen Formel 7 werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z.B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen Formel 7 aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch enzymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esterasen oder Lipasen. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

/

Ferner können Verbindungen der Formel 7 durch Lactonisierung nach den Methoden von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Caesiumcarbonat) in Verbindung der Formel 2 umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989;
Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und
Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann man auch von Epothilon C oder D ausgehen, wobei zur Derivatisierung auf die vorstehend beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann. Dabei kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin; oder epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure; oder in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilon-derivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

- 8 -

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1:

Verbindung 1a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50 μ l (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 4 mg (19 %) Isomer I

4 mg (19 %) Isomer II

Isomer I

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ν = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 [M-H₂O]⁺), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

- 9 -

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für $[M-H_2O]^+$
gef.: 493.2478

Isomer II

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.22

IR (Film): ν = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für $[M-H_2O]^+$
gef.: 493.2475

Beispiel 2:**Verbindung 1b**

55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 19 mg (32 %)

- 10 -

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.46

IR (Film): ν_{max} = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M^+]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

Hochauflösung: $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{ClNS}$ ber.: 529.2265 für [M^+],
gef.: 529.2280

Beispiel 3:

Verbindung 1c

25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151 μl (1.081 mmol) Triethylamin und 20 μl (0.517 mmol) 98 %-iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15°C werden dem Reaktionsgemisch 40 μl (0.423 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 70 Minuten bei -15°C gerührt. Nachdem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt, werden dem Reaktionsgemisch weitere 6 mg (0.047 mmol) Dimethylaminopyridin, 7 μl (0.047 mmol) Triethylamin, 2 μl 98 %-ige Ameisensäure (0.047 mmol) und 4 μl (0.047 mmol) Essigsäureanhydrid zugesetzt und 60 Minuten gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten

- 12 -

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: C₂₇H₄₂O₆NSCl ber.: 543.2421 für [M⁺]
gef.: 543.2405

Beispiel 5:

Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreagiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 - grad - nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: (20 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm⁻¹

R_f (Dichlormethan/Aceton. 90 : 10): 0.67

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M⁺]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

Beispiel 4:
Verbindung 1d

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).
Ausbeute: 1 mg (9 %)

IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs),
 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s,
 Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957
 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch)
 cm⁻¹

- 14 -

UV (Methanol): λ_{\max} (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M⁺]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]

Verbindung 3b

Ausbeute: 14 mg (13 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44

IR (Film): ν = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s), 1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{\max} (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M⁺]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1998

- 15 -

Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4 %)R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M⁺]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.2001

Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1 %)R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M⁺]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1997

Beispiel 7:

Verbindung 4a

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70 °C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch

- 16 -

präparative Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5): 0.61

IR (Film): ν_{max} = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch),
1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267
(w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M^+]), 380 (4), 267 (14), 249
(17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139
(34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43
(50).

Hochauflösung: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_7$ ber.: 398.2305 für [M^+]
gef.: 398.2295

Beispiel 8:

Verbindung 6a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 27 μl (0.180 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 μl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH_3/ml Methanol) versetzt und über

- 17 -

Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4 mg (22 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch),
1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1465 (m, Sch),
1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179
(s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m)
cm⁻¹

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M⁺]), 380 (21), 322 (37), 318
(40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151
(29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57
(26).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₅NS ber.: 475.2392 für [M⁺]
gef. 475.2384

Beispiel 9:

Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

- 18 -

Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

Ausbeute: 7 mg (15 %)

Substanzcode

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.62

IR (Film): ny - 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M⁺]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

Hochauflösung: C₂₇H₃₇O₆NS ber.: 503.2342 für [M⁺]
gef.: 503.2303

Beispiel 10:

Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150 µl einer ammoniakalischen Methanol-lösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

- 19 -

Ausbeute: 3 mg (67 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ν = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M⁺]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{NS}$ ber.: 517.2498 für [M⁺]
gef.: 517 2492

Beispiel 11:

Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

R_f (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M⁺]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

Beispiel 12:
Verbindung 7b

Ausbeute: 3 mg (59 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

IR (Film): ny - 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732
(vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246
(s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm⁻¹

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

- 21 -

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M⁺]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

Hochauflösung: C₂₉H₄₅O₈NS ber.: 567.2866 für [M⁺]
 gef.: 567.2849

Beispiel 13:

50 mg Epothilon A werden in 20 µl Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7,1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30 °C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96 %).

Beispiel 14:

48 mg Epothilonsäure 7 werden in 6 ml THF abs. gelöst und unter Rühren mit 40 µl Triethylamin und 16 µl 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb von 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon A.

Beispiel 15:

Epothilone C und D als Ausgangsverbindungen

A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilon Basispatent.

B. Produktion mit DSM 6773

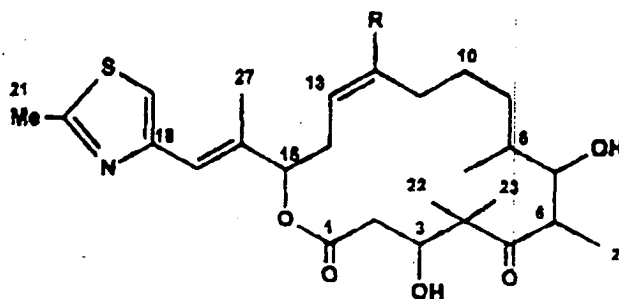
75 l Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 l Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Soyamehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 2 m³ Luft/h. Durch Regulierung der Drehzahl wird der pO₂ bei 30 % gehalten.

C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m², 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch Elution mit 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird. Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LH-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 µm, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min

Methanol/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit $R_t = 90-95$ min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute von jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

D. Physikalische Eigenschaften



Epothilon C R = H
Epothilon D R = CH₃

Epothilon C

C₂₆H₃₉NO₅S [477]

ESI-MS: (positiv Ionen): 478.5 für [M+H]⁺

¹H und ¹³C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 11,5 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

- 24 -

/

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

Epothilon D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]

ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für $[M+H]^+$

1H und ^{13}C siehe NMR-Tabelle

DC: R_f = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =
9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC: R_t = 15,3 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 $7\mu m$, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

- 25 -

Tabelle: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ bei 300 MHz

Epothilon C				Epothilon D		
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H ₃	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H ₃	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H ₃	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H ₃	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9
25-H ₃	0.90			0.91	27	14.1
26-H ₃				1.63		
27-H ₃	2.10			2.11		

*, ** Zuordnung vertauschbar

Beispiel 15:

Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

Ausbeute:

25 mg Epothilon A, $R_t = 3.5$ min (analyt. HPLC, 7 μ m, Säule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min)

und

20 mg 12,13-Bisepi-epothilon A, $R_t = 3.7$ min, ESI-MS (pos. Ionen)

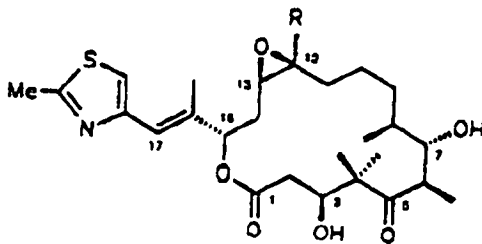
$m/z = 494 [M+H]^+$

1H -NMR in $[D_4]$ Methanol, ausgewählte Signale: $\delta = 4.32$

(3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H),

3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69

(17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).

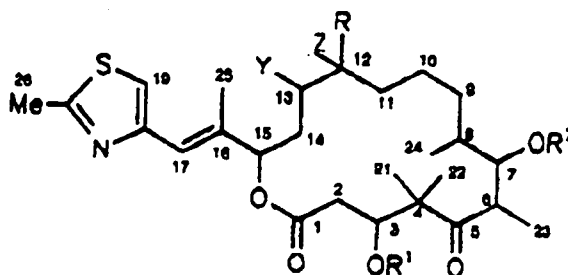


12,13-Bisepi-epothilon A R = H

- 27 -

Patentansprüche

1. Epothilonderivat der Formel 1

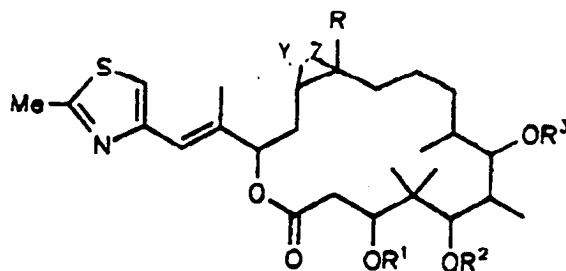


1

wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und Y und Z entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Wasserstoff, Halogen, Pseudohalogen, OH, O-(C₁₋₆)-Acyl, O-(C₁₋₆)-Alkyl oder O-Benzoyl stehen oder gemeinsam das O-Atom eines Epoxids oder eine der C-C-Bindungen einer C-C-Doppelbindung bilden, wobei Epothilon A und B ausgenommen sind.

2. Epothilonderivat der Formel 2

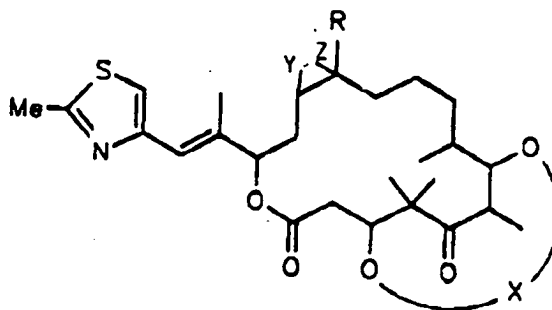
- 28 -



2

wobei $R = H, C_1-4\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2, R^3 = H, C_1-6\text{-Alkyl}, C_1-6\text{-Acyl},$
 Benzoyl, $C_1-4\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_1-6\text{-Alkoxy-}$, $C_6\text{-Alkyl-}$,
 Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

3. Epothilonderivat der Formel 3

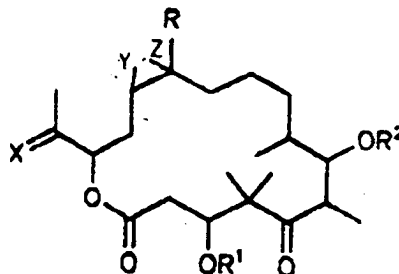


3

- 29 -

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl}, C_{1-6}\text{-Acyl},$ Benzoyl, $C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_{1-6}\text{-Alkoxy-}$, $C_6\text{-Alkyl-}$, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X allgemein für $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-S(O)-$, $-CR^1R^2-$ und $-SiR_2-$ steht, wobei R, R^1 und R^2 die Bedeutung haben wie oben angegeben und R^1 und R^2 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

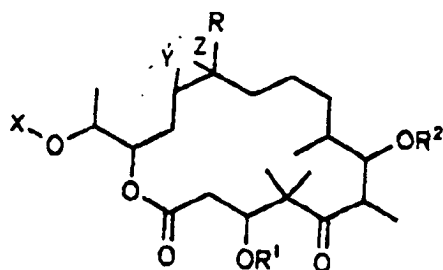
4. Epothilonderivat der Formel 4



4

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl}, C_{1-6}\text{-Acyl},$ Benzoyl, $C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_{1-6}\text{-Alkoxy-}$, $C_6\text{-Alkyl-}$, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt. X Sauerstoff, NOR^3 , $N-NR^4R^5$, und $N-NHCONR^4R^5$ bedeutet, wobei die Reste R^3 bis R^5 die oben angegebene Bedeutung haben und R^4 und R^5 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

5. Epothilonderivat der Formel 5

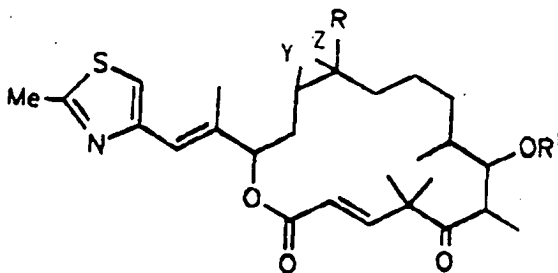


5

wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff, C₁₋₁₈-Alkyl, C₁₋₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet und

Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

6. Epothilonderivat der Formel 6

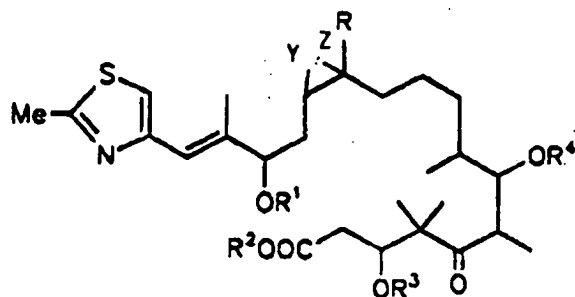


6

- 31 -

wobei $R = H$, C_1 - 4 -Alkyl und $R^1 = H$, C_1 - 6 -Alkyl, C_1 - 6 -Acyl, Benzoyl, C_1 - 4 -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_1 - 6 -Alkoxy-, C_6 -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl ist; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

7. Epothilonderivat der Formel 7



7

wobei $R = H$, C_1 - 4 -Alkyl und R^1 , R^2 , R^3 , $R^4 = H$, C_1 - 6 -Alkyl, C_1 - 6 -Acyl, Benzoyl, C_1 - 4 -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_1 - 6 -Alkoxy-, C_6 -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon A, Epothilon B, ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein 7-OH-geschütztes Derivat derselben

(a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit einer Esterase oder Lipase, oder

(b) in alkalischem Medium hydrolysiert, insbesondere mit Natriumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch, und das Epothilonderivat der Formel 7 gewinnt und isoliert.

9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 2 gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Epothilonderivat der Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des Verfahrens gemäß Anspruch 8

(a) nach der Yamaguchi-Methode oder

(b) nach der Corey-Methode oder

(c) nach der Kellogg-Methode

in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.

10. Verfahren zur Herstellung von Epothilon A und/oder 12,13-Bisepi-epothilon A, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon C epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

11. Verfahren zur Herstellung von Epothilon B und/oder 12,13-Bisepi-epothilon B, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon D epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

12. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

13. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder

- 33 -

/
mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche
1 bis 7 neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder
Verdünnungsmittel(n).

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivate und deren Verwendung.

Received

GERMAN PATENT OFFICE

In the address, give
street, house number
and, if applicable,
P.O. box number

Fill out only when
different from field
(1)

if known

see explanations and
cost information on
the reverse side

Explanation and cost
information on the
reverse side

(1)	Shipments of the German Patent Office are to be directed to: PA Dr. Hans D. Boeters c/o PAe Boeters & Bauer Bereiterangor 15 81 541 Munich		Application for granting a patent
			File No. (issued by the German Patent Office) 196 47 580.5
(2)	Reference of the Applicant/Representative (max. 20 digits) 8371-GBF	Telephone No. of the Applicant/Representative 65 00 86	Date November 18, 1996
(3)	The recipient in field (1) is the <input type="checkbox"/> Applicant <input checked="" type="checkbox"/> Power of Attorney	If applicable, No. of general power of attorney <input checked="" type="checkbox"/> Representative	
(4)	Applicant Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) Mascheroder Weg 1 38 124 Braunschweig	Representative and PA Dipl.-Eng. Robert Bauer Dr. Enno Meyer	
(5)	Application code No.	Representative code No.	Delivery address code No.
(6)	Description of the invention (if too long, submit on a separate sheet in 2 copies) Epothilone C and D, preparation and means		
(7)	Other applications <input type="checkbox"/> The application is an addition to Patent Application (to the patent) → <input type="checkbox"/> Application for examination - examination of the application (§ 44 Patent Law) <input type="checkbox"/> Application for search - determination of published documents without examination (§ 43 of the Patent Law) Supply of copies of the determined publications in <input type="checkbox"/> Examination process <input type="checkbox"/> Research process <input type="checkbox"/> Deferment of the decision of granting to _____ months (§ 49 of Section 2 of the Patent Law) (Maximum 15 months from the date of application or priority)		File No. of the main Application (of the main Patent)
(8)	Explanations <input type="checkbox"/> Division/exclusion from the Patent Application → <input type="checkbox"/> Interested in granting licenses (without obligation) <input type="checkbox"/> With prior lane open and thus agreement with free inspection of the documents (§ 31, Section 2, No. 1 of the Patent Law)		File No. of the initial Application
(9)	<input type="checkbox"/> Domestic priority (date, file No. of the prior application) <div style="text-align: right;">} in case of excessive length, submit on a separate sheet in two copies</div> <input type="checkbox"/> Foreign priority (date, country, file No. of the prior application)		
(10)	Payment of fees in an amount of DM _____ <input type="checkbox"/> Check is attached <input checked="" type="checkbox"/> Transfer (after receipt of advice of receipt) <input type="checkbox"/> Receipt stamps are attached (please do not glue on the reverse side, possibly on a separate sheet)		Deduct from my/our account at the Dresdner Bank AG, Munich <input type="checkbox"/> No.:

This Patent Application was received by the Patent Office on the date shown by the perforation [showing 11/20/96]. It has received the file No. shown by "P".

This file number is to be quoted on all communications according to the rules for making application. In case of payment, please include the purpose to which it is to be applied.

To be filled out only by the receiving office:

☐ The stamps in an amount of DM _____ are _____ (Please note the information on the reverse side regarding the retained copy of the Application)

[illegible] for the above application.

[Application received by fax. Notification of receipt already issued.]

1

1

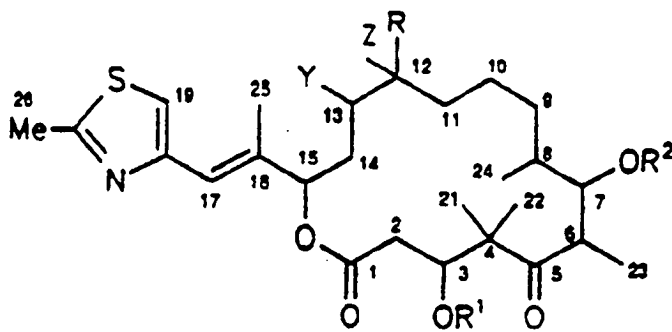
Confidential
/

Our reference: 8371-GBF

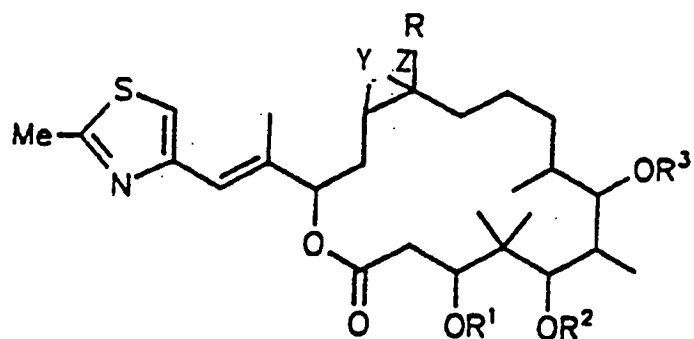
November 18, 1996/he

Epothilone C and D, Preparation and Means

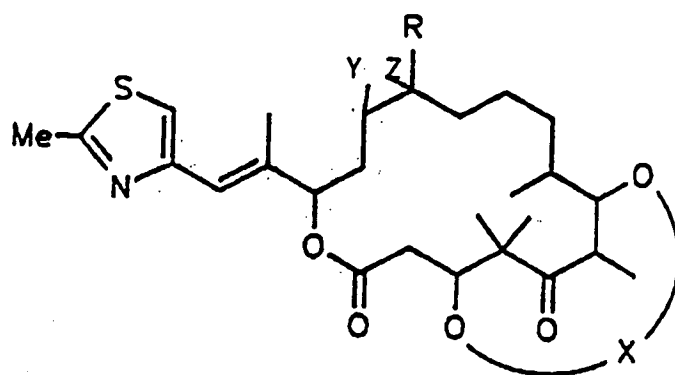
The present invention concerns general epothilone derivatives and their use for the production of drugs. Especially, the present invention is concerned with the preparation of epothilone derivatives according to the general Formulas 1 to 7 given below, as well as with their use for the production of therapeutic agents and agents for plant protection.



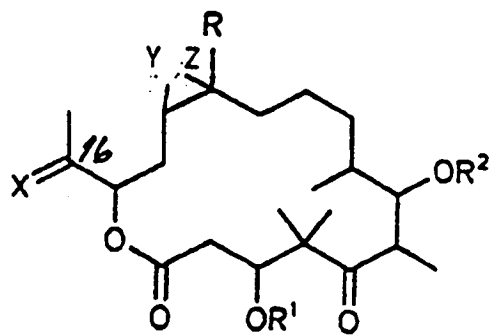
1



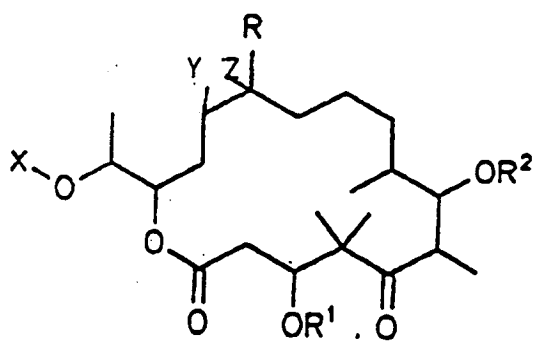
2



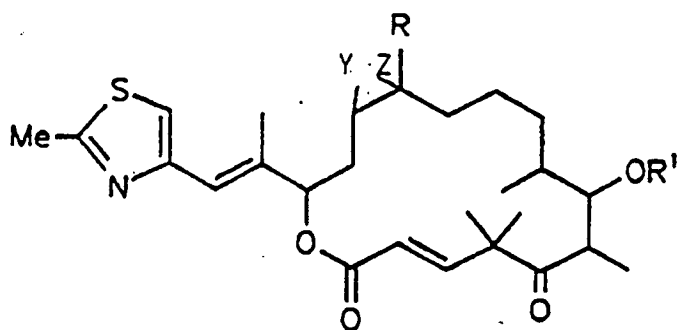
3



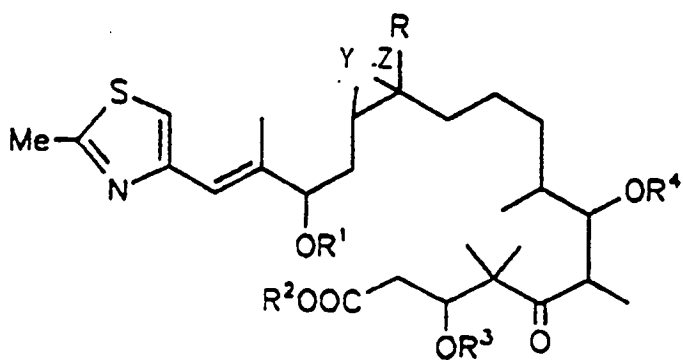
4



5



6



7

In the above **Formulas 1 to 7**, the symbols have the following meanings:

R = H, C₁₋₄-alkyl;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁₋₆-alkyl,

C₁₋₆-acyl-benzoyl,

C₁₋₄-trialkylsilyl,

benzyl,

phenyl,

C₁₋₆-alkoxy-,

C₆-alkyl-, hydroxy and halogen-substituted benzyl or phenyl;

also, two of the groups R¹ to R⁵ may be combined to form the grouping -(CH₂)_n- with n = 1 to 6 and the alkyl or acyl groups contained in the groups are either straight-chain or branched groups;

Y and Z are either identical or different and can stand for hydrogen, halogens, such as F, Cl, Br or I, pseudohalogens, such as -NCO, -NCS or -N₃, OH, O-(C₁₋₆)-acyl, O-(C₁₋₆)-alkyl, O-benzoyl. Y and Z can also be the O-atom of an epoxide, in which case, epothilone A and B are not claimed, or one of the C-C bonds can form a C=C double bond.

In **Formula 3**, X generally stands for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R²-, where R¹ and R² have the meaning given above and -SiR₂-, where R has the meaning given above.

In **Formula 4**, X stands for oxygen, NOR³, N-NR⁴R⁵, and N-NHCONR⁴R⁵, where the groups R³ to R⁵ have the meaning given above.

In **Formula 5**, X stands for hydrogen, C₁₋₁₈-alkyl, C₁₋₁₈-acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl.

With regard to epothilone A and B, let us refer to DE-A-41 38 042. Compounds according to general **Formula 1** are accessible starting from epothilone A and B, as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by opening the 12,13-epoxide. When hydrogen halides are used for this purpose in a preferred nonaqueous solvent, the halohydrins X = Hal, Y = OH and Y = OH, Y = Hal are obtained. Protonic acids, for example, toluenesulfonic acid and trifluoroacetic acid, lead to 12,13-diols in the presence of water and then these are

acylated subsequently according to standard methods (for example, with carboxylic acid anhydrides and pyridine or triethylamine/DMAP) or are alkylated (alkyl halides and silver oxide). For this purpose, the 3- and 7-hydroxy groups can be protected temporarily as the formate (cleaved with NH_3/MeOH) or p-methoxybenzyl ether (cleaved with DDQ).

Compounds according to general **Formula 2** are obtainable from epothilone A and B as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by reduction, for example, with NaBH_4 in methanol. If the 3-OH and/or 7-OH groups are protected reversibly during this process, after acylation or alkylation, and removal of the protecting groups, 5-O-monosubstituted, 3,5- or 5,7-O-disubstituted derivatives according to general **Formula 2** can be obtained.

Reactions of epothilone A and B with bifunctional electrophilic reagents, such as (thio)phosgene, (thio)carbonyldimidazole [sic], thionyl chloride or dialkylsilyl dichlorides or bistriflates give compounds having general **Formula 3**. The bases used as aids here can be pyridine, trialkylamine, optionally together with DMAP or 2,6-lutidine in an aprotic solvent. The 3,7-acetals having general **Formula 3** are formed by transacetalization, for example, of dimethylacetals, in the presence of an acidic catalyst.

Compounds according to general **Formula 4**, obtained from epothilone A and B or from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by ozonolysis and reductive processing, for example, with dimethyl sulfide. The C-16 ketones can then be converted to the oximes, hydrazones or semicarbazones according to standard methods known to the expert in the field. Furthermore, they are converted into C-16/C-17 olefins by the Wittig, Wittig-Horner, Julia or Petersen olefination method.

The 16-hydroxy derivatives according to general **Formula 5** are obtainable by reduction of the C-16 keto group, for example, with aluminum hydride or borohydride. When the 3-OH and 7-OH groups are protected correspondingly, they can be acylated or alkylated selectively. The liberation of the 3-OH- and 7-OH groups is done, for example, with NH_3/MeOH in the case of O-formyl and with DDQ in the case of O-p-methoxybenzyl.

The compounds having general **Formula 6** are obtained from derivatives of epothilone A and B in which the 7-OH group is protected by acyl or ether groups, in which the 3-OH group is, for example, formylated, mesylated or tosylated and then eliminated by treatment with a base, for example, DBU. The 7-OH group can be liberated as described above.

Compounds having general **Formula 7** are obtained from epothilone A and B or from their 3-OH- and 7-OH-protected derivatives by basic hydrolysis, for example, with NaOH in MeOH or MeOH/water. Preferably, the compounds having general **Formula 7** are obtained from epothilone A or B or from their 3-OH- or 7-OH-protected derivatives by enzymatic hydrolysis, preferably with esterases or lipases. The carboxyl group can be converted into the ester by alkylation with diazoalkanes after protection of the 19-OH group.

Furthermore, compounds having **Formula 7** can be converted into the compound having **Formula 2** by lactonization according to the methods of Yamaguchi (trichlorobenzoyl chloride/DMAP), Corey (aldrithiol/triphenylphosphine) or Kellogg (omega-bromic acid/cesium carbonate). The corresponding methods can be found in Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; and Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

In order to prepare the compounds according to the invention, one can also start from epothilone C or D, and the derivatization methods described above can be used for derivatization here, too. The 12,13-double bond can be hydrogenated selectively, for example, catalytically or with diimine; or it can be epoxidized, for example, with dimethyldioxiran or a peracid; or it can be converted into the dihalides, dipseudohalides or diazides.

Furthermore, the invention is concerned with means for plant protection in agriculture, forestry and/or gardening, consisting of one or several of the epothilone derivatives described above or consisting of one or several of the epothilone derivatives described above in addition to one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

Finally, the invention is concerned with therapeutic agents, consisting of one or several of the compounds listed above or of one or several of the compounds listed above in addition to

one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s). These agents can exhibit especially cytotoxic activities and/or cause immunosuppression and/or can be used for combatting malignant tumors, but they can especially preferably be used as cytostatic agents.

The invention is explained further and described by the description of a few selected practical examples.

Examples

Translator's note: In the infrared spectra in the examples, the general English abbreviations are used, s, m, w, vs, b, etc., except for Sch = shoulder and ny = ν (nu). Also, the abbreviation lg stands for log.

Example 1:

Compound 1a

20 mg (0.041 mmole) of epothilone A is dissolved in 1 mL of acetone, with 50 μ L (0.649 mmole) of trifluoroacetic acid is added and the mixture is stirred overnight at 50°C. For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M pH 7 phosphate buffer and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer-chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 4 mg (19%) isomer I

4 mg (19%) isomer II

Isomer I

R_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

IR (Film): ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm⁻¹.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 [M-H₂O]⁺), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

High resolution: $C_{26}H_{39}O_6NS$ calculated: 493.2498 for $[M-H_2O]^+$
found: 493.2478

Isomer II

R_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.22

IR (Film): ν = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727
(vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265
(s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$), 394 (12), 306 (46),
206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100),
113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

High resolution: $C_{26}H_{39}O_6NS$ calculated: 493.2498 for $[M-H_2O]^+$
found: 493.2475

Example 2:

Compound 1b

Epothilone A, 55 mg (0.111 mmole), is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, 0.5[sic] mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture is stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 N phosphate buffer of pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/methanol, 90:10). Yield: 19 mg (32%).

R_f (dichloromethane/methanol, 90:10): 0.46

IR (Film): ν = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M^+]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{ClNS}$ calculated: 529.2265 for [M^+],
found; 529.2280

Example 3:

Compound 1c

12-Chloro-13-hydroxy-epothilone A (**1b**), 25 mg (0.047 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, and then 29 mg (0.235 mmole) of dimethylaminopyridine, 151 μL (1.081 mmole) of triethylamine and 20 μL (0.517 mmole) of 98% formic acid are added. The reaction mixture is cooled with ice/sodium chloride. After reaching -15°C , 40 μL (0.423 mmole) of acetic anhydride is added to the reaction mixture, followed by stirring for 70 minutes at -15°C . Since the thin-layer chromatogram did not show complete conversion, another 6 mg (0.047 mmole) of dimethylaminopyridine, 7 μL (0.047 mmole) of triethylamine, 2 μL of 98% formic acid (0.047 mmole) and 4 μL (0.047 mmole) of acetic anhydride are added to the reaction mixture, followed by stirring for 60 minutes. For work-up, the reaction mixture is heated to room temperature, 1 M phosphate buffer with pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 90:10). Yield: 5 mg (18%).

R_f (Dichloromethane/acetone, 90-10): 0.67

IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M⁺]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

High resolution: C₂₉H₄₀O₉NSCl calculation: 613.2112 for [M⁺]
found: 613.2131

Example 4:

Compound 1d

10 mg (0.020 mmole) of epothilone B is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, then 0.5 mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 M phosphate buffer at pH 7 is added and the aqueous phase is extracted 4 times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from solvent. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 1 mg (9%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

High resolution: $C_{27}H_{42}O_6NSCl$ calculated: 543.2421 for $[M^+]$
found: 543.2405

Example 5:

Compound 2a

Epothilone A, 100 mg (0.203 mmole), is dissolved in 4 mL of tetrahydrofuran/1 M phosphate buffer, pH 7 (1:1) and sodium borohydride (150 mg = 3.965 mmole) is added until the thin-layer chromatogram shows that the starting material reacted completely. Then the mixture is diluted with 1 M phosphate buffer, pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done by silica gel chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 95:5 - in 5 steps to dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: (20%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 75:25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 $[M^+]$), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

High resolution: $C_{26}H_{41}O_6NS$ calculated: 495.2655 for $[M^+]$
found: 495.2623

Example 6:

Compound 3a-d (a-d are stereoisomers)

Epothilone, 100 mg (0.203 mmole) is dissolved in 3 mL of pyridine, with 50 μ L (0.686 mmole) of thionyl chloride added and the mixture is stirred for 15 minutes at room tempera-

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s),
1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m,
Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076
(w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br,
Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08)
nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M⁺]), 475 (17), 322 (41), 306
(67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178
(32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113
(15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42),
41 (19).

High resolution: C₂₆H₃₇O₇NS₂ calculated: 539.2011 for [M⁺]
found: 539.1998

Compound 3c

Yield: 4 mg (4%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M⁺]), 322 (22), 306 (53), 222
(36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96
(25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

High resolution: C₂₆H₃₇O₇NS₂ calculated: 539.2011 for [M⁺]
found: 539.2001

Compound 3d

Yield: 1 mg (1%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M⁺]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

High resolution: C₂₆H₃₇O₇NS₂ calculated: 539.2011 for [M⁺]
found: 539.1997

Example 7:

Compound 4a

Epothilone A, 10 mg (0.020 mmole), is dissolved in 2 mL of dichloromethane, cooled to -70°C and then treated with ozone for 5 minutes until a weak blue coloration develops. The resulting reaction mixture is then treated with 0.5 mL of dimethyl sulfide and heated to room temperature. In the work-up, the solvent is removed from the reaction mixture and finally the product is purified with preparative layer chromatography (solvent dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5).

Yield: 5 mg (64%)

R_f (Dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch),
1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M⁺]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

High resolution: $C_{21}H_{34}O_7$ calculated: 398.2305 for $[M^+]$
found: 398.2295

Example 8:

Compound 6a

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 10 mg (0.018 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, 27 μ L (0.180 mmole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred at room temperature for 60 minutes.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. After elimination of the solvent, the resulting crude product is dissolved in 1 mL of methanol, treated with 200 μ L of ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH_3 /mL of methanol) and stirred overnight at room temperature. For work-up, the solvent is removed in vacuum.

Yield: 4 mg (22%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

IR (Film): ν = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch),
1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch),
1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179
(s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m)
 cm^{-1}

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 $[M^+]$), 380 (21), 322 (37), 318
(40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151
(29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57
(26).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_5NS$

calculated: 475.2392 for $[M^+]$

found: 475.2384

Example 9:

Compound 6b

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 50 mg (0.091 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloroethane, 2 mL (0.013 mole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred for 12 hours at 90°C.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent removed. The purification of the crude product, which consists of two compounds, is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 90:10).

Yield: 7 mg (15%)

Substance code

R_f (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 $[M^+]$), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

High resolution: $C_{27}H_{37}O_6NS$ calculated: 503.2342 for $[M^+]$
found: 503.2303

Example 10:

Compound 6c

3,7-Di-O-acetyl-epothilone, 5 mg (0.009 mmole), is dissolved in 1 mL of methanol, 150 μ L of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH_3 /mL of methanol) is added and the mixture stirred overnight at 50°C.

For work-up, the solvent is removed in vacuum and the crude product is purified with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (67%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.55

IR (Film): ν = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 $[M^+]$), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

High resolution: $C_{28}H_{39}O_6NS$ calculated: 517.2498 for $[M^+]$
found 517.2492

Example 11:

Compound 7a

Epothilone, 20 mg (0.041 mmole), is dissolved in 0.5 mL of methanol, 0.5 mL of 1 N sodium hydroxide is added and the mixture stirred for 5 minutes at room temperature.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography. (Solvent: dichloromethane/methanol, 85:15).

Yield: 11 mg (52%)

R_f (Dichloromethane/methanol, 85:15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch),
1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383
(m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch),
1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s)
cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M⁺]), 323 (4), 168 (89), 140
(100), 85 (31), 57 (67).

High resolution: C₂₃H₃₇O₄NS calculated: 423.2443 for [M⁺]
found: 423.2410

Example 12:

Compound 7b

5 mg (0.009 mmole) of 7-O-acetyl-epothilone is dissolved in 1 mL of methanol, 200 μ L of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH₃/mL of methanol) is added and the mixture is stirred for 2 days at 50°C. For work-up, the solvent is removed in vacuum. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (59%)

Example 15:

Epothilone C and D as starting compounds

A. Production stock and culture conditions corresponding to the basic epothilone patent

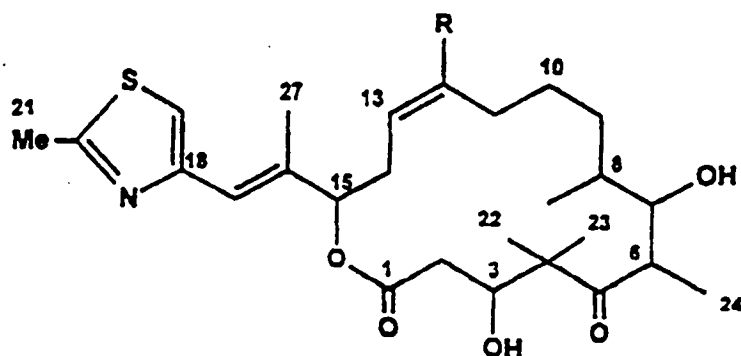
B. Production with DSM 6773

A culture, 75 L, is raised as described in the basic patent and was used for inoculating a production fermenter with 700 L of production medium consisting of 0.8% starch, 0.2% glucose, 0.2% soy meal, 0.2% yeast extract, 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L of Fe-EDTA, pH = 7.4 and optionally 15 L of adsorbent resin Amberlite XAD-16. The fermentation takes 7-10 days at 30°C, aeration with 2 m³ of air/hour. The pO₂ is kept at 30% by adjusting the rate of rotation.

C. Isolation

The adsorbent resin is separated from the culture with a 0.7 m², 100 mesh process filter and the polar accompanying substance is removed from it by washing with 3 bed volumes of water/methanol 2:1. Upon elution with 4 bed volumes of methanol, a crude extract is obtained, which is evaporated in vacuum until the appearance of the water phase. This is extracted three times with the same volume of ethyl acetate. Evaporation of the organic phase gives 240 g of crude extract, which is partitioned between methanol and heptane in order to remove any lipophilic accompanying substances. Thus, 180 g of raffinate is obtained from the methanol phase by evaporation in vacuum; this is fractionated into three portions on Sephadex LH-20 (volume 20 x 100 cm, 20 mL/min methanol). The epothilones are contained in the fraction eluted with a retention time of 240-300 minutes, a total amount of 72 g being obtained. To separate the epothilones, the product is chromatographed in three portions on Lichrosorb RP-18 (15 μm, column 10 x 40 cm, solvent 180 mL/minute methanol/water 65:35). After epothilone A and B, epothilone C is eluted with R_t = 90-95 minutes and epothilone D with 100-110 minutes and after evaporation in vacuum, they are obtained as colorless oils, each in an amount of 0.3 g.

D. Physical properties



Epothilone C R = H

Epothilone D R = CH₃

Epothilone C

C₂₆H₃₉NO₅S [477]

ESI-MS: (positive ions): 478.5 for [M+H]⁺

¹H and ¹³C see NMR table

TLC: R_f = 0.82

TLC-aluminum foil 60 F 254 Merck, solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinguishing at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray coloration upon heating to 120°C.

HPLC: R_t: 11.5 min

Column: Nucleosil 100 C-18 7μm, 125 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 mL/min

Detection: diode array

Epothilone D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]

ESI-MS: (positive ions): 492.5 for $[M+H]^+$

1H and ^{13}C , see NMR table

TLC: $R_f = 0.82$

TLC-aluminum foil 60 F 254 Merck, solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinguishing at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray coloration upon heating to 120°C.

HPLC: $R_t = 15.3$ min

Column: Nucleosil 100 C-18 $7\mu m$, 125 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 mL/min

Detection: diode array

Table: ^1H and ^{13}C -NMR data of epothilone C and epothilone D in $[\text{D}_6]$ DMSO at 300 MHz

Epothilone C				Epothilone D			
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	
		1	170.3		1	170.1	
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0	
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8	
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2	
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4	
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4	
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5	
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3	
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9	
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9	
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*	
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3	
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3	
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*	
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6	
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2	
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2	
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1	
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7	
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3	
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9	
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7	
21-H ₃	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5	
22-H ₃	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4	
23-H ₃	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4	
24-H ₃	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9	
25-H ₃	0.90			0.91	27	14.1	
26-H ₃				1.63			
27-H ₃	2.10			2.11			

*, ** Assignment interchangeable.

Example 15: [This should be Example 16]

Epothilone A and 12,13-bisepi-epothilone A from epothilone C

Epothilone A, 50 mg, is dissolved in 1.5 mL of acetone and 1.5 mL of a 0.07 molar solution of dimethyldioxiran in acetone is added. After standing for 6 hours at room temperature, it is evaporated in vacuum and separated by preparative HPLC on silica gel (solvent: methyl-tert.butyl ether/petroleum ether/methanol 33:66:1).

Yield:

25 mg epothilone A, $R_f = 3.5$ min (analyt. HPLC, 7 μ m, column 4 x 250 mm, solvent see above, flow rate 1.5 mL/min)

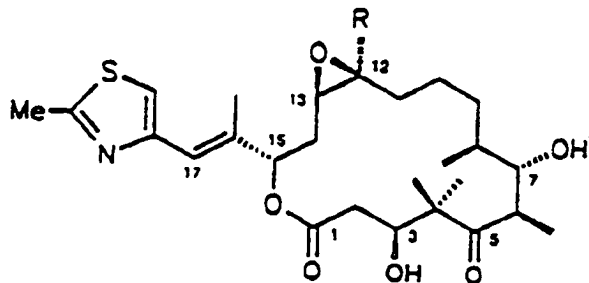
and

20 mg of 12,13-bisepi-epothilone A, $R_f = 3.7$ min, ESI-MS (positive ions)

$m/z = 494 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ in $[\text{D}_4]$ methanol, selected signals:

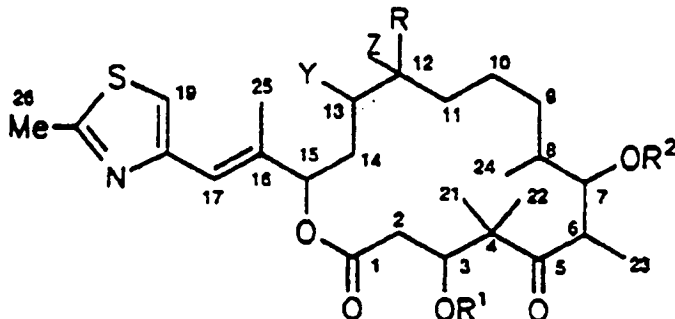
$\Delta = 4.32$ (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-bisepi-epothilone A $R = \text{H}$

Patent Claims

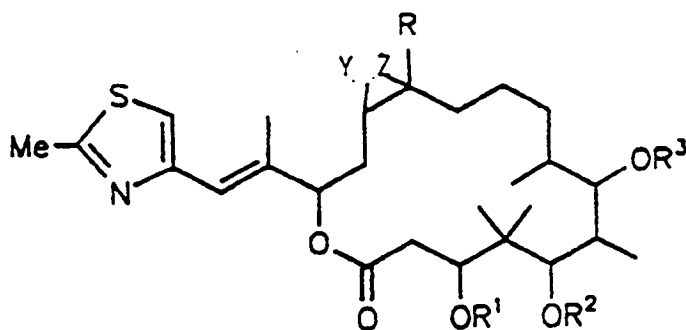
1. Epothilone derivative having Formula 1



1

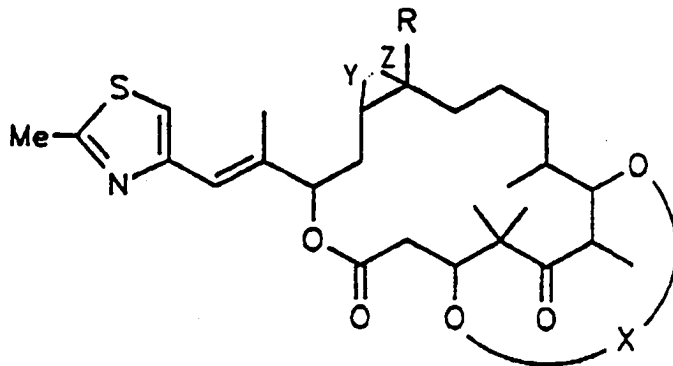
where R = H, C₁₋₄-alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-acyl, benzoyl, C₁₋₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁₋₆-alkoxy, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and the alkyl and acyl groups in these groups are straight-chain or branched groups and Y and Z are either the same or different and stand for hydrogen, halogen, pseudohalogen, OH, O-(C₁₋₆)-acyl, O-(C₁₋₆-alkyl or O-benzoyl or together form the O-atom of an epoxide or one of the C-C bonds form a C=C double bond, where epothilone A and B are excepted.

2. Epothilone derivative having formula 2



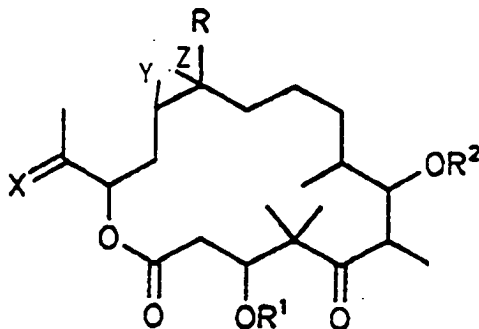
2

3. Epothilone derivative according to formula 3



3

4. Epothilone derivative according to formula 4

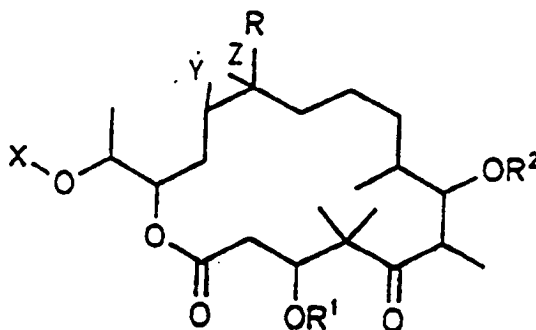


4

where $R = H, C_{1-4}\text{-alkyl}$; $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}\text{-alkyl}, C_{1-6}\text{-acyl}, \text{benzoyl}, C_{1-4}\text{-trialkylsilyl}, \text{benzyl}, \text{phenyl}, C_{1-6}\text{-alkoxy-}, C_6\text{-alkyl-}, \text{hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl}$; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; X stands for oxygen, NOR^3 , $N-NR^4R^5$, and $N-NHCONR^4R^5$, where the groups R^3 to R^5 have the meaning given above and R^4 and R^5 together can form an alkylene group with 2 to 6 carbon atoms; and

Y and Z have the meaning according to Claim 1.

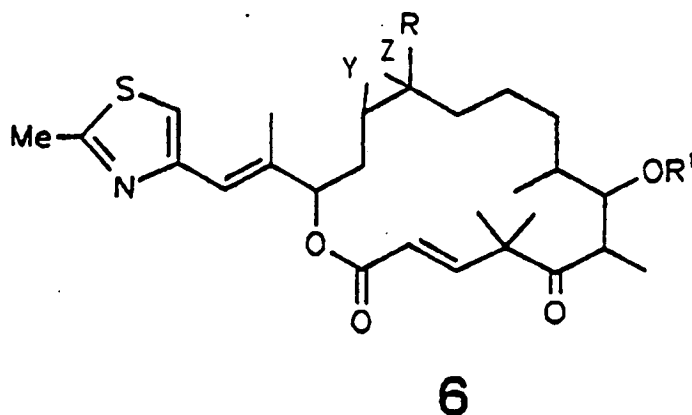
5. Epothilone derivative having formula 5



5

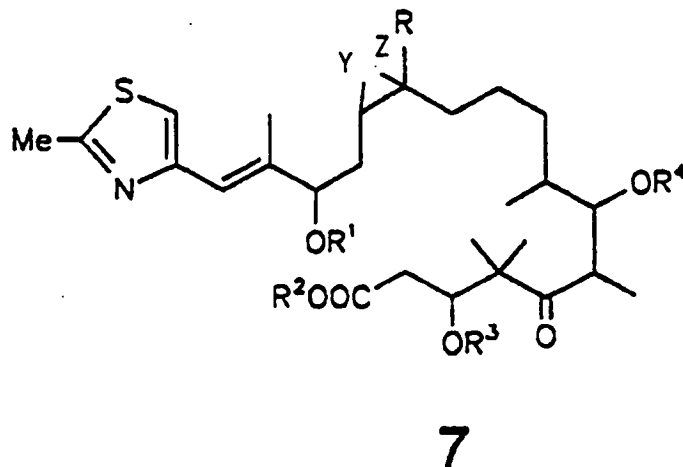
where $R = H, C_{1-4}\text{-alkyl}$; $R^1, R^2 = H, C_{1-6}\text{-alkyl}, C_{1-6}\text{-acyl}, \text{benzoyl}, C_{1-4}\text{-trialkylsilyl}, \text{benzyl}, \text{phenyl}, C_{1-6}\text{-alkoxy-}, C_6\text{-alkyl-}, \text{hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl}$; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and X stands for hydrogen, $C_{1-18}\text{-alkyl}, C_{1-18}\text{-acyl}, \text{benzyl}, \text{benzoyl and cinnamoyl}$ and Y and Z have the meaning according to Claim 1.

6. Epothilone derivative according to formula 6



in which R = H, C₁₋₄-alkyl and R¹ = H, C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-acyl, benzoyl, C₁₋₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁₋₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; and Y and Z have the meaning given in Claim 1.

7. Epothilone derivative according to formula 7



in which R = H, C₁₋₄-alkyl; and R¹, R², R³, R⁴ = H, C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-acyl, benzoyl, C₁₋₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁₋₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; and Y and Z have the meaning according to Claim 1.

8. Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, *characterized by the fact* that epothilone A, epothilone B, a 3-OH-protected derivative of these or a 7-OH-protected derivative of these is

- (a) hydrolyzed enzymatically, especially with an esterase or lipase, or
- (b) is hydrolyzed in an alkaline medium, especially with sodium hydroxide, in a methanol/water mixture, and the epothilone derivative having formula 7 is obtained and isolated.

9. Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 2, according to Claim 2, *characterized by the fact* that an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, or as product of the method according to Claim 8, is converted into the epothilone derivative having formula 2 according to

- (a) the Yamaguchi method or
- (b) the Corey method or
- (c) the Kellogg method

and then this conversion product is isolated.

10. Method for the preparation of epothilone A and/or 12, 13-bisepi-epothilone A, *characterized by the fact* that epothilone C is epoxidized, especially with dimethyl dioxiran or a peracid.

11. Method for the preparation of epothilone B and/or 12,13-bisepi-epothilone B, *characterized by the fact* that epothilone D is epoxidized, especially with dimethyldioxiran or a peracid.

12. Means for plant protection in agriculture and forestry and/or in gardening, consisting of one or several of the compounds according to one of the previous Claims, or according to one or several of these compounds together with one or several usual carrier(s) and/or diluent(s).

13. Therapeutic agent, especially for use as cytostatic agent, consisting of one or several of the compounds according to one or several of Claims 1 to 7, or one or several compounds according to one or several of Claims 1 to 7 together with one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

Summary

The present invention is concerned with epothilone derivatives and their application.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.